



PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
(Case No. 00,1287)

In the Application of:

)

Jourdier et al.

)

Examiner: To be assigned

Serial No.: 09/746,581

)

Group Art Unit: 1646

Filing Date: December 21, 2000

)

RECEIVED

For: Mucosally Targeting Immunization

)

MAR 23 2001

TECH CENTER 1600/2900

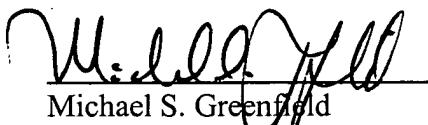
SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicants hereby submit a certified copy of the French priority document.

Respectfully submitted,

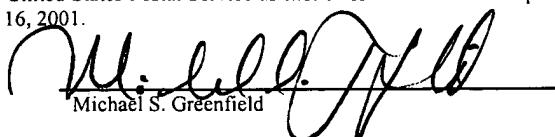

Michael S. Greenfield
Reg. No. 37,142

Date: March 16, 2001

CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. 1.8a)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner for Patents, Washington D.C. 20231, on March 16, 2001.

Date: March 16, 2001


Michael S. Greenfield



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 NOV. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Martine Planche".

Martine PLANCHE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

26 JUIN 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 08354

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

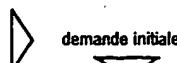
L7

DATE DE DÉPÔT

26 JUIN 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet LAVOIX
2, place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS Cedex 09

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

AC/DL BFF98/0251 01 53 20 14 20

 certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

 différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

 oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Immunisation de la muqueuse buccale

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

PASTEUR MERIEUX Sérum & Vaccins

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

58 Avenue Leclerc
69348 LYON CEDEX 07

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

GIBAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

La présente invention concerne une méthode d'immunisation permettant d'induire une réponse immunitaire locale dans la région muqueuse buccale. Elle a également pour objet l'utilisation d'immunogènes pour la réalisation de compositions immunogènes destinés à être administrées selon ladite méthode.

5 La voie de transmission principale du virus du SIDA est constituée par les muqueuses, en particulier muqueuses génitale et rectale, voire muqueuse buccale. Depuis ces muqueuses, le virus dissémine rapidement vers les ganglions drainants, avant de rejoindre le sang périphérique.

10 Comme dans le cas des autres agents pathogènes (virus, bactérie, etc...) à porte d'entrée mucosale, l'induction d'immunité capable de bloquer le virus à son entrée dans la muqueuse ou dans les premières étapes de sa dissémination dans les ganglions paraît importante.

Des travaux sur l'immunisation locale par administration orale, génitale ou rectale ont été menés sans avoir été couronnés de succès.

15 Les travaux de Lehner et al., (Nature Medicine 1996, 2 : 767-775) réalisés chez le macaque rhésus ont montré qu'il est possible d'induire une immunité locale vis-à-vis du virus SIV, en effectuant une injection sous-cutanée profonde dans la région pélvienne au voisinage des ganglions iliaques. Cette immunisation se traduit par l'induction d'anticorps de type IgA et IgG dans les fluides, rectal, 20 urinaire et dans le sérum.

Une telle méthode d'immunisation est difficile à mettre en œuvre et en particulier elle n'est pas applicable à l'homme.

Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de méthode d'immunisation mucosale ciblant la région buccale, qui soit réellement efficace et utilisable dans la pratique courante de la médecine humaine ou vétérinaire.

La présente invention s'est donc donnée pour objectif de proposer une voie d'administration permettant d'induire simplement et aisément une immunité locale au niveau de la région muqueuse buccale chez les hôtes suivants : mammifères, en particulier l'homme, et les oiseaux.

30 Un objectif particulier de l'invention est de proposer une telle voie d'immunisation pour développer une immunité locale contre le virus du SIDA (HIV).

Un autre objectif de l'invention est d'induire simultanément une immunité systémique.

Un autre objectif encore de l'invention est de proposer un mode d'immunisation qui pourra être très avantageusement combiné à une immunisation classique pour la compléter et de manière générale à tout autre type d'immunisation, locale ou systémique.

La présente invention a ainsi pour objet le développement d'une réponse locale au niveau de la muqueuse buccale et des ganglions qui la drainent par administration d'une composition immunogène dans des conditions appropriés ciblant notamment les ganglions sous-maxillaires. Cela peut notamment être obtenu en administrant la composition immunogène par injection parentérale, e.g. par injection sublinguale dans le plancher de la bouche. On induit la production d'immunoglobulines localement au niveau de cette muqueuse, dans les sécrétions (salive) et régionalement, au niveau des ganglions qui drainent cette région et qui induisent la production de cellules B sécrétrices d'anticorps, tout en induisant une immunité systémique. Cette immunité est susceptible d'induire une protection contre l'entrée et la dissémination du pathogène considéré depuis cette région muqueuse buccale.

L'invention s'applique aussi bien au domaine de la prophylaxie (e.g. 20 vaccins) qu'au domaine de l'immunothérapie active. Le terme composition immunogène recouvre donc les compositions à visée prophylactique, en particulier vaccins, et les compositions à visée curative dans lesquelles l'immunogène est de type antigène.

Un premier objet de l'invention est donc l'utilisation d'immunogène 25 spécifique d'un agent pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse buccale, pour la production d'une composition immunogène destinée à être administrée de manière à développer une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et des ganglions drainant cette muqueuse, notamment des ganglions sous-maxillaires. L'injection sublinguale dans le plancher de la bouche est le moyen 30 préféré notamment pour permettre le recrutement des cellules B productrices d'IgG dans les ganglions drainant la région muqueuse buccale.

Il ne peut pas être exclu non plus la production d'anticorps IgA et le recrutement local des cellules B sécrétrices d'IgA comme on l'a constaté dans l'essai rapporté au point III des exemples.

La présente demande a donc aussi pour objet une telle utilisation conduisant à développer en outre une réponse locale en anticorps IgA et en cellules B productrices d'IgA.

Parmi les agents pathogènes auxquels l'invention peut s'appliquer, on citera tout particulièrement :

- le virus HIV,
- les virus Herpes, e.g. Herpes simplex
- les Candida
- les virus des hépatites, notamment hépatite A
- les Picornaviridae, notamment entérovirus tels que virus de la poliomyélite
- les Réovirus, notamment Rotavirus
- les Adénovirus,
- le Papillomavirus humain
- les pathogènes impliqués dans les infections de la bouche, en particulier parodontoses.

Il convient de noter que ce mode d'administration ne se limite pas à induire une réponse locale, et peut permettre également d'induire en même temps une réponse systémique, les deux actions se combinant, et se complétant, voire se renforçant, de manière particulièrement avantageuse.

En conséquence, l'utilisation conforme à l'invention vise aussi à développer en plus d'une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG et éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA, une réponse systémique de type IgG et éventuellement de type IgA (anticorps et cellules B sécrétrices).

Sans qu'il soit besoin de le préciser à chaque fois, il va de soi que lorsqu'on parle d'une réponse en IgG ou IgA, anticorps et cellules B sécrétrices, il s'agit d'une réponse spécifique à l'immunogène utilisé.

Un autre objet de l'invention est la méthode d'immunisation contre des agents pathogènes tels que décrits plus haut, consistant à administrer par tout

5 moyen connu en soi, la composition immunogène appropriée de façon à induire une réponse locale comme décrit plus haut. Sans qu'il soit besoin de le rappeler à chaque fois, la méthode d'immunisation peut reprendre chacune des caractéristiques, seules ou en combinaison, énoncées ici dans le cadre de l'utilisation. On rappellera que l'injection sublinguale dans le plancher de la bouche est le moyen préféré.

Dans le cadre de l'utilisation et de la méthode d'immunisation, on peut préciser encore que l'invention s'applique à tous les types de compositions immunogène et notamment vaccins connus, qu'ils soient de type classique ou de 10 type recombinant. Comme cela est connu en soi, les compositions, e.g. vaccins de type classique regroupent les compositions, e.g. vaccins entiers vivants atténués ou inactivés, les sous-unités (protéines ou peptides), ces compositions, e.g. vaccins classiques pouvant être adjuvés ou non adjuvés et pouvant être présentés sous forme combinées regroupant différentes valences et/ou différentes formes 15 immunogènes d'une même valence. Les compositions, e.g. vaccins recombinants regroupent les vecteurs vivants exprimant un ou plusieurs immunogènes du pathogène considéré ainsi que les vecteurs plasmidiques polynucléotidiques constitués d'un ADN qui peut être par exemple nu ou inclus dans un liposome (voir e.g. WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797, WO-A-95 20660) et 20 qui expriment un ou plusieurs immunogènes. Pour ce qui est des vecteurs vivants recombinants, on peut citer en particulier comme vecteurs les poxvirus, tels que le virus de la vaccine et surtout les poxvirus aviaires (canarypox, fowlpox, pigeonpox, etc.), tels que ceux décrits dans Tartaglia et al., Virol. 1992, 188 : 217, ainsi que 25 les adénovirus. S'agissant d'une nouvelle voie d'administration, il est bien évident que l'invention ne peut pas être limitée à un type particulier de composition, e.g. de vaccin, mais a vocation à s'appliquer à tous les types de compositions immunogène, e.g. de vaccins et à toutes les compositions, e.g. vaccins disponibles utilisables par cette voie.

30 De même, le protocole d'immunisation sera fonction du type de composition ou de vaccin ou de la composition ou de vaccin utilisé. Il incluera le nombre d'administrations habituellement utilisé pour un vaccin donné ce qui, de manière générale, correspondra à plus d'1 administration, notamment de 2 à 4. L'homme

du métier est de toute façon parfaitement à même par des essais de routine de déterminer le nombre optimum d'administrations (e.g. primo-vaccination et rappel).

Cette immunisation ciblée pourra aussi être associée à une immunisation systémique classique par la même composition ou une autre composition contre le 5 même pathogène.

On peut aussi lui associer chez le même hôte un protocole d'immunisation ciblant la muqueuse recto-génito-urinaire comportant l'administration d'une composition immunogène contre le même pathogène identique ou différent, notamment de la même composition, de préférence par injection parentérale dans 10 la cuisse (l'un ou les deux membres inférieurs droit et gauche), de préférence par voie intramusculaire, en particulier dans les quadriceps, notamment dans le muscle droit antérieur. Cette immunisation de la muqueuse recto-génito-urinaire vise à induire une réponse locale anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG et éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA au niveau de 15 cette muqueuse et des ganglions drainant cette muqueuse, notamment des ganglions iliaques externes et internes et des ganglions inguinaux (elle peut aussi s'accompagner d'une réaction systémique).

Une telle combinaison est particulièrement utile pour prévenir ou traiter une infection par un pathogène ayant à la fois les portes d'entrée buccale et recto-génito-urinaire. On peut citer notamment le virus HIV, les Herpèsvirus. 20

En conséquence, selon un développement avantageux de la présente invention, l'utilisation d'immunogène spécifique d'un pathogène donné vise la production d'une part d'une composition immunogène, identique ou différente de la précédente, destinée à être administrée à un hôte par voie parentérale de 25 manière à induire une réponse en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG, éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA, au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et des ganglions drainant cette muqueuse, en particulier ganglions sous-maxillaires, et de préférence par injection sublinguale dans le plancher de la bouche, et d'autre part une composition immunogène, identique ou différente de la précédente, destinée à être administrée au même 30 hôte par voie parentérale dans la cuisse, de préférence par voie intramusculaire, notamment dans le quadriceps, en particulier dans le muscle droit antérieur, de

manière à induire une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG, éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA, au niveau des muqueuses recto-génito-urinaires.

5 La méthode d'immunisation correspondante prévoit donc cette double administration.

Cette immunisation ciblant les muqueuses recto-génito-urinaires s'accompagne aussi d'une immunisation systémique qui se combine avantageusement à celle résultant de l'immunisation ciblant la muqueuse buccale.

10 On peut aussi combiner ces deux immunisations locales à une immunisation systémique classique, en utilisant une même composition ou des compositions différentes dirigées contre le même pathogène.

L'utilisation et la méthode d'immunisation conformes à l'invention trouvent une application préférée dans le cadre de la vaccination contre le virus HIV.

15 Un exemple particulier est l'utilisation d'un vaccin regroupant un vecteur exprimant gp120/gp160 de HIV et de la sous-unité glycoprotéique gp120/gp160 de ce même virus. Un exemple particulier est décrit plus loin.

20 Dans le cadre de la présente invention, on prévoit ainsi de mettre en œuvre ce vaccin anti-HIV pour son administration visant la muqueuse buccale comme décrit plus haut, éventuellement combiné à une administration intramusculaire dans la cuisse et/ou systémique classique, e.g. par injection intramusculaire dans le deltoïde.

25 Enfin, l'invention a encore pour objet une composition de vaccin comprenant un vaccin contre un pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse buccale et un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, ce véhicule ou excipient, ou cette composition, conduisant, en liaison avec le vaccin, à une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau de cette région muqueuse, lorsque la composition est notamment administrée par voie intramaxillaire dans le plancher de la bouche. Dans le cadre de cette composition de vaccin, les caractéristiques énoncées ici au regard des autres objets de l'invention, peuvent être reprises seules ou en combinaison.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs :

EXEMPLES

5

I.- Vaccin

I-1 - vaccin vivant recombinant vCP205, ALVAC-HIV :

vCP205 est un virus canarypox ALVAC dont la construction est décrite à l'exemple 14 de WO-A-95 27507 auquel l'homme du métier pourra se reporter. Il est capable d'exprimer les gènes *env*, *gag* et *pro* du virus HIV-1. Ces gènes sont 10 insérés dans le locus C3 et sont régulés par les promoteurs H6 et I3L du virus de la vaccine.

Un plasmide pHIV32 contenant les cassettes d'expression pour le gène de la glycoprotéine *env* gp120 MN (plus la partie transmembranaire de gp41 LAI) et les gènes de la souche LAI codant pour *gag* et pour la protéase *pro*, a été utilisé 15 comme plasmide donneur dans une procédure de recombinaison *in vivo* pour produire le vCP205. Ces cassettes ont été insérées dans le locus C3, entre les séquences flanquantes d'ALVAC, dans une configuration 5'-5', et liées aux promoteurs H6 et I3L.

Le vCP205 a été produit sur fibroblastes d'embryons de poulets en milieu 20 DMEM-Ham F12 sans sérum, additionné de lactoglutamate et clarifié par centrifugation. Le titre moyen était de $10^{8.0}$ DICC₅₀/ml sur cellules QT35. On prépare les solutions vaccinantes par dilution en PBS ("phosphate buffer saline") avec Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺.

I-2- vaccin de sous-unité gp160MN/LAI-2

La sous-unité produite est une sous-unité gp160 hybride obtenue à partir 25 d'un vecteur pox.

On utilise un vecteur vaccine VVTG9150 pour produire la gp160. Ce vecteur code pour une gp160 soluble hybride dans laquelle la partie gp120 est dérivée de la souche HIV-1 MN et la partie gp41 provient de l'isolat LAI. Les 30 séquences d'ADN correspondantes ont été fusionnées à l'aide d'un site de restriction artificiel SmaI ne modifiant aucune des deux séquences d'acide aminés de gp120 et gp41. On décrit ci-après brièvement la construction.

La séquence codant pour gp120 MN a été amplifiée à partir de cellules SupT1 infectées par HIV-MN, par technique PCR avec des oligonucléotides introduisant un site de restriction SphI et un site SmaI respectivement immédiatement en aval de la séquence codant pour la peptide leader et en amont des sites de clivage situés entre gp120 et gp41.

La séquence codant pour gp41 a été ainsi produite : la séquence codante complète de env HIV-1 LAI a été placée sous le contrôle du promoteur pH5R du virus de la vaccine. Plusieurs modifications ont été apportées. Un site de restriction SphI a été créé immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide leader, sans altérer la séquence en acides aminés. On a aussi créé un site de restriction SmaI immédiatement en amont de la séquence codant pour les sites de clivage entre gp120 et gp41, sans altérer la séquence en acides aminés. Les deux sites de clivage en position 507-516 (numérotation des acides aminés selon Myers et al. dans : Human retroviruses and AIDS (1994) Los 10 Alamos National Lab. (USA)) ont été mutés (séquence originale : KRR ... REKR mutée en QNH ... QEHN). La séquence codant pour le peptide hydrophobe transmembranaire IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (acides aminés 689-710 d'après Myers et al. supra) a été déletée. Un codon stop a été introduit à la place du deuxième codon E de la séquence codant pour PEGIEE (acides aminés 735-740 15 d'après Myers et al.), c'est-à-dire le 29^{ème} acide aminé du domaine intracytoplasmique.

Le plasmide dans lequel la séquence LAI était insérée entre les régions homologues du gène TK du virus de la vaccine, a été coupé par SphI et SmaI, puis lié à la séquence gp120 MN. Le VVTG9150 a ensuite été construit par recombinaison homologue conventionnelle et propagé pour assurer l'expression de la gp160 selon la méthode habituellement utilisée pour vCP205 sur cellules BHK21. Le gp160 a ensuite été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité.

II Essais 1

Deux macaques rhésus femelles (P9224 et P9225) déjà immunisées par voie intramusculaire (dans les cuisses gauche ou droite, alternativement) 2 fois avec 30 $10^{6.5}$ DICC₅₀ de l'ALVAC-HIV (vCP205) clarifié, puis 3 fois avec 100 µg de gp160 MN/LAI-2 adjuvée avec de l'OspA ("outer surface protein A" de *Borrelia*

burgdorferi) et de l'hydroxyde d'alumine, ont été inoculées 2 fois à 1 mois d'intervalle, dans le plancher de la bouche (sublinguale), avec un mélange contenant 10^6 DICC₅₀ de vCP205 clarifié et 100 µg de gp160 MN/LAI-2. La salive, l'urine, les sécrétions vaginales et rectales ainsi que le sérum ont été analysés par ELISA pour détecter la présence d'IgA et d'IgG anti-gp160 et anti-CPpp (contre le virus canarypox lui-même).

5 L'un des deux singes (P9225) a reçu une injection supplémentaire du même mélange (vCP205 + gp160 MN/LAI-2) dans le plancher de la bouche ainsi que le haut de la cuisse droite, trois mois après la dernière injection. Les 10 lymphocytes du sang périphérique et de certains ganglions lymphatiques (sous-maxillaires, axillaires, inguinaux et iliaques) ont été analysés en ELISPOT pour la détection de cellules B productrices d'anticorps IgA et IgG spécifiques de gp160 et CPpp.

15 Il a pu être montré l'apparition d'IgA anti-gp160 et anti-CPpp dans le lavage de bouche du macaque P9224, mais pas dans celui du singe P9225, après les première et deuxième injections sublinguales. Mis à part quelques rares 20 prélèvements, les autres sécrétions muqueuses testées (urine, lavages vaginaux et rectaux) sont restées négatives en IgA anti-gp160 (spécificité anti-CPpp non étudiée). L'un des lavages vaginaux positifs s'est d'ailleurs avéré majoritairement contaminé par du sang, après dosage de l'albumine par ELISA, en liaison probablement avec le cycle menstruel de cette femelle. Au contraire, les réponses IgG spécifiques anti-gp160 sont apparues dès la première injection dans la plupart des sécrétions testées et se sont maintenues tout au long de l'étude.

25 Par ailleurs, les sérum des deux macaques ont montré une augmentation significative des IgA et IgG spécifiques de gp160 et CPpp.

Enfin, il a été mis en évidence par ELISPOT, chez le singe P9225, une induction préférentielle de cellules B sécrétrices d'anticorps IgA⁺ et IgG⁺ anti-gp160 et anti-CPpp dans les ganglions lymphatiques ciblés par les immunisations, à savoir les ganglions sous-maxillaires et inguinaux droits. Ces cellules étaient 30 présentes également dans le sang périphérique, mais à plus faible fréquence.

Pour conclure, ce test a montré la possibilité d'induire une réponse anticorps locale et systémique anti-HIV-1 chez le singe rhésus après immunisation

à proximité de ganglions drainant les muqueuses buccales et recto-génito-urinaires.

III Essais 2

Le vaccin est un mélange contenant $10^{6.3}$ DICC₅₀ de vCP205 et 100 µg de sous-unité gp160.

On a aussi utilisé un vecteur ALVAC ne comprenant aucune séquence HIV, comme témoin.

- Groupe 1 :

10 4 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du mélange vaccinal par voie sublinguale dans le plancher de la bouche ; mélange à volume égal de vCP205 à $10^{6.9}$ DICC₅₀/ml et de gp160 à 400 µm/ml ; 0,25 ml à droite et 0,25 ml à gauche.

- Groupe 2 :

15 4 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du mélange vaccinal par voie intramusculaire dans la cuisse (perpendiculaire au, et dans le muscle droit antérieur) ; mélange à volume égal de vCP205 à $10^{6.6}$ DICC₅₀/ml et de gp160 à 200 µg/ml ; 0,5 ml à droite et 0,5 ml à gauche.

- Groupe 3 (témoins) :

20 3 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du vecteur ALVAC par voie intramusculaire dans la cuisse ; ALVAC (CPpp) à $10^{6.3}$ DICC₅₀/ml ; 0,5 ml à droite et 0,5 ml à gauche.

25 On a mesuré le nombre de lymphocytes B sécrétors d'IgG⁺ totales, spécifiques de la gp160 (résultant des deux types de vaccins) et spécifiques du vecteur ALVAC témoin pour 10^6 cellules mononucléées, par prélèvement et dans chaque groupe de macaques. La moyenne et l'écart-type calculés ont été arrondis à l'unité la plus proche.

30 Les ganglions droits et gauches de chaque catégorie (sous-maxillaires, axillaires, inguinaux, iliaques internes, iliaques externes) ont été prélevés après sacrifice de l'animal, broyés (les ganglions sous-maxillaires droits et gauches ont été poolés), puis soumis à l'analyse des cellules productrice d'anticorps par la

technique ELISPOT (adaptée de Eriksson K. et al., *Journal of Immunological methods*, 153 : 107-113, 1992).

Une réponse systémique en anticorps IgG a aussi été constatée.

Les résultats de comptage des lymphocytes B sécrétateurs d'IgG sont
5 rassemblés dans le tableau qui suit :

Groupe (nb de singes/groupe)		Immunisation : Voie Immunogène		Prélèvement (sacrifice à S14, après 4 injections)		Lymphocytes B IgG+ pour 10 ⁶ cellules mononucléées		
						Total	gp160	CPPp
1 (n = 4)	Injection sublinguale ALVAC-HIV (vCP205) + gp160 MN/LAI-2	Sang		167±48	1±0	1±1		
		Ganglions sous-maxillaires		1168±271	190±127	141±63		
		Ganglions axillaires		430±311	0±0	2±2		
		Ganglionsiliaques internes		662±345	2±1	2±1		
		Ganglionsiliaques externes		396±508	1±1	3±3		
		Ganglions inguinaux		320±83	1±1	2±1		
		Sang		152±40	1±0	2±0		
		Ganglions sous-maxillaires		575±156	2±1	2±1		
		Ganglions axillaires		1251±393	2±0	2±1		
		Ganglionsiliaques internes		657±188	9±4	4±6		
2 (n = 4)	Injection IM (cuisse) ALVAC-HIV (vCP205) + gp160 MN/LAI-2	Ganglionsiliaques externes		752±179	277±146	226±175		
		Ganglions inguinaux		817±199	62±88	11±13		
		Sang		173±46	0±0	3±1		
		Ganglions sous-maxillaires		540±148	0±0	1±1		
		Ganglions axillaires		624±132	0±0	1±0		
		Ganglionsiliaques internes		612±67	0±0	4±4		
		Ganglionsiliaques externes		700±162	0±0	248±202		
		Ganglions inguinaux		531±83	0±0	210±80		
3(n = 3)	Injection IM (cuisse) Vecteur ALVAC (CPPp)							

Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais en englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'immunogène spécifique d'un agent pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse buccale, pour la production d'une composition immunogène destinée à être administrée de manière à développer une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et des ganglions drainant la muqueuse, notamment des ganglions sous-maxillaires.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à être administrée par injection sublinguale dans le plancher de la bouche.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à développer aussi une réponse systémique.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à développer aussi une réponse locale en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la composition immunogène est dirigée contre un pathogène choisi dans le groupe consistant en :
 - le virus HIV,
 - les virus herpès, e.g. herpes simplex
 - les Candida
 - les virus des hépatites, notamment hépatite A
 - les Picornaviridae, notamment entérovirus tels que virus de la poliomyélite
 - les Réovirus, notamment Rotavirus
 - Les Adénovirus
 - le Papillomavirus humain
 - les parodontoses.